

09/147389 #7
96009M attached
(95195M)
(94215M)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-127115

(43) 公開日 平成9年(1997)5月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/533			G 0 1 N 33/533	
A 6 1 K 49/00			A 6 1 K 49/00	A
C 0 9 B 23/00			C 0 9 B 23/00	L
C 0 9 K 11/06		9280-4H	C 0 9 K 11/06	Z
G 0 1 N 33/574			G 0 1 N 33/574	Z
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 19 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-13775
(22) 出願日 平成8年(1996)1月30日
(31) 優先権主張番号 特願平7-12283
(32) 優先日 平7(1995)1月30日
(33) 優先権主張国 日本(J P)
(31) 優先権主張番号 特願平7-223613
(32) 優先日 平7(1995)8月31日
(33) 優先権主張国 日本(J P)

(71) 出願人 390037327
第一化学薬品株式会社
東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(72) 発明者 伊東 進
徳島県徳島市北田宮1丁目1番40号
(72) 発明者 野沢 正之
千葉県柏市十余二287-16-301
(72) 発明者 志賀 匡宣
熊本県熊本市小山町1226-39
(72) 発明者 佐々本 一美
熊本県上益城郡益城町古閑51-55
(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

最終頁に続く

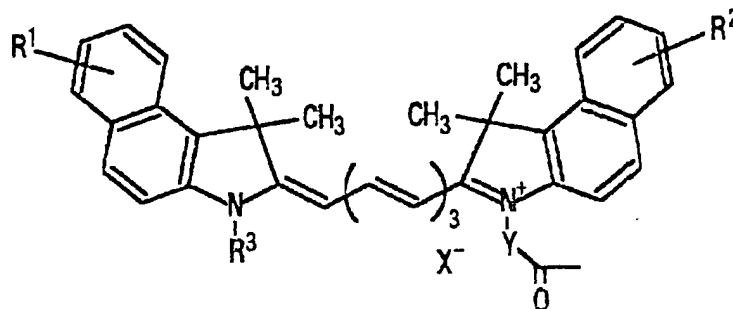
(54) 【発明の名称】 診断用マーカー

(57) 【要約】

【解決手段】 (a)例えば抗体などの検出系、及び(b)該検出系に結合した下記式(R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子又はアルキル基などを示し; R³はアルキル基又はスルホン酸アルキル基などを示し; X⁻は必要に応じてアニオン種を示し; Yは炭素数1ないし10のアルキレ*

*ン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキレン基を示す)で示される蛍光性官能基を含む診断用マーカー。

【化1】



【効果】 近赤外線ないし遠赤外線の照射によって 780 nm 以上の波長の蛍光を発するので、赤外線内視鏡検査

または外科手術時の病巣の特定などに有用である。

1

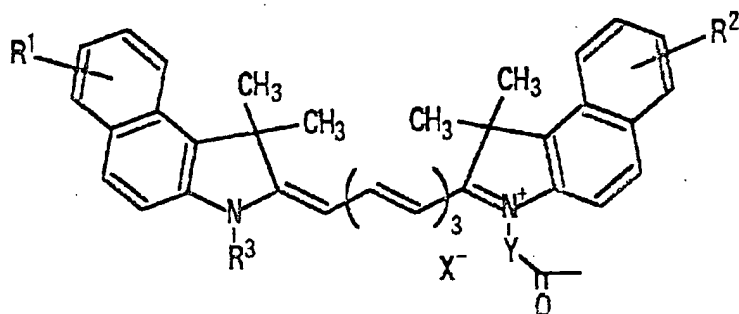
2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) 検出系と、(b) 該検出系に結合した*

*下記の式：

【化 1】

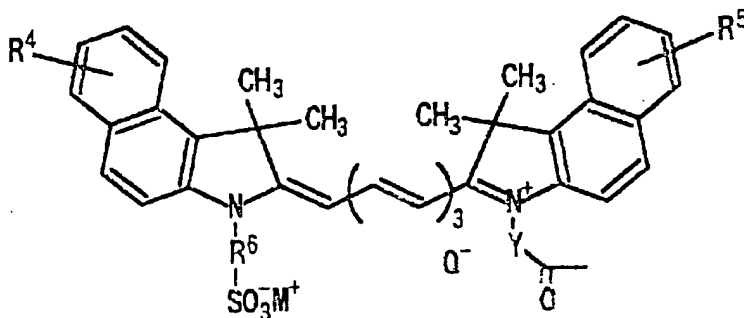


(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、又はスルホン酸基を示し； R^3 はアルキル基、スルホン酸アルキル基又はアミノ置換アルキル基を示し； X^- は必要に応じてアニオン種を示し； Y は炭素数 1 ないし 10 のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ば*

※れる 1 以上の原子を含む炭素数 1 ないし 10 のアルキレン基を示す) で示される蛍光性官能基とを含む診断用マーカー。

【請求項 2】 (a) 検出系と、(b) 該検出系に結合した下記の式：

【化 2】



(式中、 R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホネート基を示し； R^6 はアルキレン基を示し； M^+ はアルカリ金属イオンを示し； Q^- はハロゲンイオン、過塩素酸イオン、又はチオシアン酸イオンを示し； Y は炭素数 1 ないし 10 のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる 1 以上の原子を含む炭素数 1 ないし 10 のアルキレン基を示す) で示される蛍光性官能基とを含む診断用マーカー。

【請求項 3】 蛍光性官能基が検出系に直接結合した請求項 1 又は 2 に記載の診断用マーカー。

【請求項 4】 蛍光性官能基が検出系にリンカーあるいは蛋白を介して結合した請求項 1 又は 2 に記載の診断用マーカー。

【請求項 5】 検出系が抗体、核酸、および増幅系物質からなる群から選ばれる請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の診断用マーカー。

【請求項 6】 抗体として抗ガン抗原抗体、抗細菌抗体、又は抗ウイルス抗体を用いる請求項 5 に記載の診断用マーカー。

【請求項 7】 近赤外線ないし遠赤外線の照射によって 780 nm 以上の波長の蛍光を発する請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の診断用マーカー。

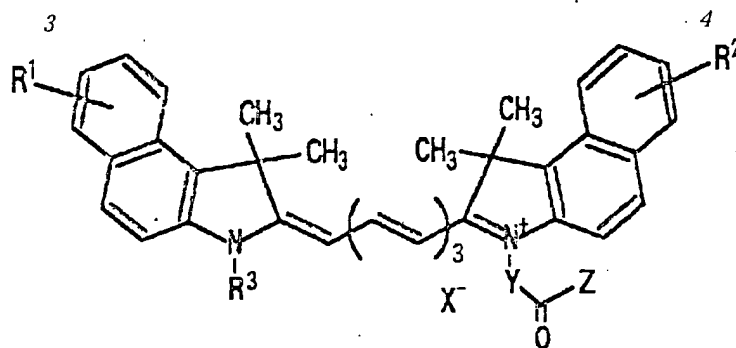
【請求項 8】 赤外線内視鏡検査または外科手術時の病巣の特定に使用する請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の診断用マーカー。

【請求項 9】 免疫組織化学的染色法により生体の組織を直接染色するために用いる請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の診断用マーカー。

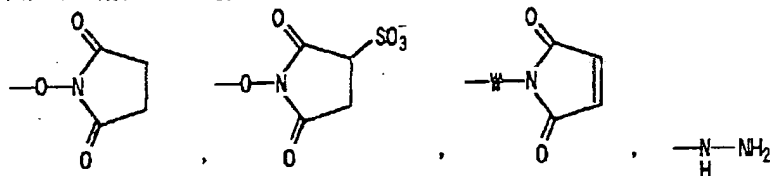
【請求項 10】 請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の診断用マーカーを有効成分として含む診断薬。

【請求項 11】 下記の式：

【化 3】



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、又はスルホン酸基を示し； R^3 はアルキル基、スルホン酸アルキル基又はアミノ基を示し； R^2 は置換アルキル基を示し； X^- は必要に応じてアニオン種を示し； Z は下記の式：

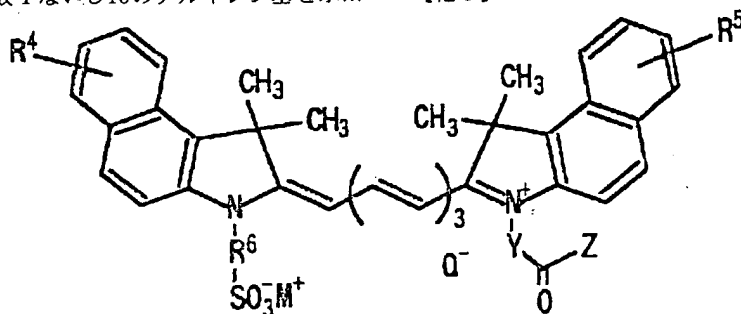


からなる群から選ばれる基を示し； W 及び Y はそれぞれ独立に炭素数1ないし10のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキレン基を示す

※) で示される標識化合物を検出系と反応させる工程を含む請求項1に記載の診断用マーカの製造方法。

【請求項12】 下記の式：

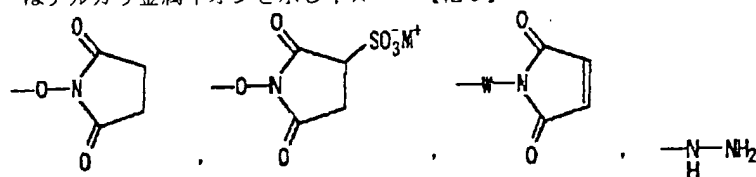
【化5】



(式中、 R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホネート基を示し； R^6 はアルキレン基を示し； M^+ はアルカリ金属イオンを示し；★

★ Q^- はハロゲンイオン、過塩素酸イオン、又はチオシアン酸イオンを示し； Z は下記の式：

【化6】



からなる群から選ばれる基を示し； W 及び Y はそれぞれ独立に炭素数1ないし10のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキレン基を示す) で示される標識化合物を検出系と反応させる工程を含む請求項2に記載の診断用マーカの製造方法。

【請求項13】 検出系と該検出系に結合した600～800 nmの波長の励起光を照射することにより780 nm以上の波長の蛍光を発する蛍光性官能基を含む診断用マー

カー。

【請求項14】 蛍光性官能基が、シアニン系、フタロシアニン系、ジチオールニッケル錯体系、ナフトキノ・アントラキノ系、インドフェノール系、及びアゾ系からなる群から選ばれる近赤外線吸収性化合物に由来する蛍光性官能基である請求項13に記載の診断用マー

カー。
【請求項15】 蛍光性官能基が検出系に直接結合した請求項13または14に記載の診断用マー

【請求項16】 蛍光性官能基が検出系にリンカーあるいは蛋白を介して結合した請求項13または14に記載の診断用マーカー。

【請求項17】 検出系が抗体、核酸、および増幅系物質からなる群から選ばれる請求項13ないし16のいずれか1項に記載の診断用マーカー。

【請求項18】 抗体として抗ガン抗原抗体を用いる請求項17に記載の診断用マーカー。

【請求項19】 赤外線内視鏡検査または外科手術時の病巣の特定に使用する請求項13ないし17のいずれか1項に記載の診断用マーカー。

【請求項20】 免疫組織化学的染色法により生体の組織を直接染色するために用いる請求項13ないし19のいずれか1項に記載の診断用マーカー。

【請求項21】 請求項13ないし20のいずれか1項に記載の診断用マーカーを有効成分として含む診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は診断用マーカーに関する。さらに詳しくは、本発明は、組織の障害性の少ない近赤外線あるいは遠赤外線の照射により励起されて蛍光を発する標識用化合物にガン細胞などを特異的に認識する抗体などを結合させることにより製造される生体に適用可能な診断用マーカーに関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、電子内視鏡の普及によって内視鏡診断が容易になり、胃ガンや大腸ガンなどが初期ガンの状態で確実に発見できるようになっている。もっとも、微小ガンの診断に関しては、電子内視鏡と通常内視鏡を用いた場合の診断能はほとんど同程度である。これは電子内視鏡の機能を活かした新しい診断方法が未だ確立されていないことを意味している。通常内視鏡では識別できない程度の微小病変でも、電子内視鏡下に検知し得る標識抗体で微小病変を標識することができれば、コンピューター処理を用いて画像化することにより容易に検出することができる可能性があるが、このような方法は未だ実用化されていない。

【0003】電子内視鏡を用いた上記のような診断方法を確立するためには、免疫組織化学的染色法により生体組織を直接染色することが必要である。固定化標本の染色法はすでに確立された技術である。しかしながら、非固定化標本の染色法は未だ当業者に利用可能な技術ではない。例えば、非固定化標本の免疫染色法については報告があるが(四国医学雑誌, 29, 180, 1987)、近赤外線を用いた当該領域での切除新鮮標本や生体組織そのものの免疫染色法は未だ報告されていない。

【0004】一方、上記の診断方法には電子内視鏡下に検知し得る診断用マーカー(標識化された抗体など)も必要である。紫外線による励起されて紫外・可視光の蛍光を発する標識用化合物を抗体に結合した診断用マーカー

が知られており、生体外に摘出された組織中に存在するガン細胞やガン組織の検出に汎用されている。しかしながら、紫外線により励起する蛍光性診断用マーカーを用いる方法は、紫外線により生体組織やDNAの損傷がおきるので生体に適用することはできない。生体に直接適用できる診断用マーカーは未だ知られていない。

【0005】インドシアニンググリーン(ICG)は赤外線内視鏡下で特異な吸収を示して蛍光を発することが知られている。赤外線内視鏡を用いてインドシアニンググリーンを使用した例が知られているが(Gastroenterological Endoscopy, 34, pp.2287-2296, 1992; 及び Gastrointestinal Endoscopy, 40, pp.621-2;628, 1994)、これらはいずれも血管内にICGを投与したものである。また、一般的に、インドシアニンググリーンを始めとする蛍光性色素は疎水性が高く、単体で腸管内に投与された場合に速やかに吸収されるので、母核あるいは側鎖部分に親水性のスルホニル基などを導入することにより水溶性を高め、測定効率の向上と吸収後の毒性の問題を回避する試みがなされている。しかしながら、インドシアニンググリーンと同程度の蛍光を発する水溶性の標識用化合物は未だ知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、免疫組織化学的染色法により生体の組織を直接染色するのに有用な診断用マーカーを提供することにある。本発明の別の課題は、組織の障害性の少ない近赤外線ないし遠赤外線の照射によって蛍光を発し、生体に直接使用可能な診断用マーカーを提供することにある。すなわち、紫外線励起による生体組織やDNAの損傷の心配がなく生体にも適用可能な診断用マーカーを提供することが本発明の課題である。このような特徴を有し、かつ水溶性に優れた診断用マーカーを提供することも本発明の課題の一つである。

【0007】また本発明は、赤外線内視鏡などを用いた準体內的な食道ガン、胃ガン、または大腸ガンなど上皮性組織における悪性新生物や感染症などの早期診断や外科手術時の病巣の特定あるいは診断に有用な、生体に適用可能な診断用マーカーを提供することを課題としている。また、このような診断用マーカーを用いて、生体組織を免疫組織化学的染色法により直接染色する方法を提供することも本発明の他の課題である。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、インドシアニンググリーンの誘導体を種々合成することにより、近赤外線ないし遠赤外線により励起され蛍光を発するインドシアニンググリーン誘導体を製造することに成功した。また、本発明者らは、上記のインドシアニンググリーン誘導体を標識用化合物として用いて抗ガン抗原抗体等と反応させることにより、生体に直接適用可能な診断用のマーカーを製造する

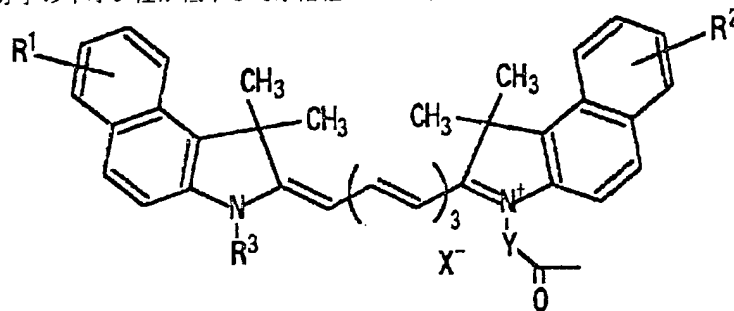
ことができること、並びに、そのような診断用マーカーが免疫組織化学的染色法により生体組織を直接染色するのに有用であることを見出した。

【0009】さらに、本発明者らは水溶性に優れた診断用マーカーを提供すべく鋭意研究を行った結果、上記のインドシアニングリーン誘導体のうち、分子内対イオン(ツピッターイオン)を形成可能な化合物については、対イオンの形成により分子のイオン性が低下して水溶性*

*が損なわれる場合があるが、該誘導体にヨウ化ナトリウムなどを作用させると分子内で対イオンが形成されず、分子全体のイオン性が保たれて水溶性が顕著に増大することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0010】すなわち本発明は、(a) 検出系と、(b) 該検出系に結合した下記の式(I)：

【化7】

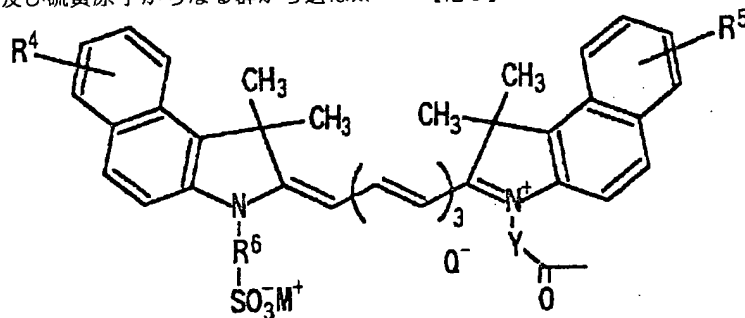


(式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アリーール基、アルコキシ基、又はスルホン酸基を示し；R³はアルキル基、スルホン酸アルキル基又はアミノ置換アルキル基を示し；X⁻は必要に応じてアニオン種を示し；Yは炭素数1ないし10のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ば

※れる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキレン基を示す)で示される蛍光性官能基とを含む診断用マーカーを提供するものである。

【0011】また、本発明の別の態様によれば、(a) 検出系と、(b) 該検出系に結合した下記の式(II)：

【化8】



(式中、R⁴及びR⁵はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホネート基を示し；R⁶はアルキレン基を示し；M⁺はアルカリ金属イオンを示し；Q⁻はハロゲンイオン、過塩素酸イオン、又はチオシアン酸イオンを示し；Yは炭素数1ないし10のアルキレン基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキレン基を示す)で示される蛍光性官能基とを含む診断用マーカーが提供される。

【0012】さらに本発明の別の態様によれば、検出系と該検出系に結合した600～800 nmの波長の励起光を照射することにより780 nm以上の波長の蛍光を発する蛍光性官能基とを含む診断用マーカーが提供される。以上に加えて、上記の各発明の好ましい態様によれば、蛍光性官能基が検出系に直接結合した上記の各診断用マーカー；蛍光性官能基が検出系にリンカーあるいは蛋白を介して結合した上記の各診断用マーカー；検出系が抗体、

核酸、および増幅系物質からなる群から選ばれる上記の各診断用マーカー；抗体として抗ガン抗原抗体を用いる上記の各診断用マーカー；赤外線内視鏡検査または外科手術時の病巣の特定に使用する上記の各診断用マーカー；及び、免疫組織化学的染色法により生体の組織を直接染色するために用いる上記の各診断用マーカー；並びに、上記の各診断用マーカーを有効成分として含む診断薬が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】上記一般式(I)及び(II)で示される蛍光性官能基は、母核に結合した-Y-C(=O)-基のカルボニル基を介して検出系と結合している。上記一般式(I)中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホン酸基(-SO₃H)を示す。R¹及びR²は、それぞれフェニル基上の任意の位置に置換することができる。アルキル基としては、炭素数1ないし6程度の直鎖又は分枝の低級アルキル基、好ましくは炭素

数1ないし4の直鎖又は分枝の低級アルキル基を用いることができる。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基などが好適である。

【0014】 R^1 及び R^2 が示すアリール基としては置換又は無置換のフェニル基、ナフチル基、ピリジル基などを用いることができる。アルコキシ基としては、炭素数1ないし6程度、好ましくは炭素数1ないし4の直鎖又は分枝の低級アルコキシ基を用いることができ、より具体的には、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*tert*-ブトキシ基などを用いることが好適である。スルホン酸基としては、遊離形態の $-SO_3H$ 基の他、スルホン酸基の塩基付加塩（スルホネート基）、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などを用いることができる。これらのうち、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホネート基であることが好ましい。

【0015】 R^3 はアルキル基、スルホン酸アルキル基又はアミノ置換アルキル基を示す。これらの基において、アルキル基としては、例えば上記のものを使用することができる。スルホン酸アルキル基のスルホン酸基あるいはアミノ置換アルキル基のアミノ基は、それぞれアルキル基上のいかなる位置に置換していてもよいが、例えば、アルキル基の末端に置換したものを用いることができる。

【0016】スルホン酸基及びアミノ基は、それぞれ塩基付加塩及び酸付加塩を形成していてもよい。例えば、スルホン酸がナトリウム塩やカリウム塩を形成したものや、アミノ基がアンモニウムハライド等の塩を形成したもの、アミノ基が4級化されたものなども好ましい。また、アミノ基として置換または無置換のアミノ基を用いることができる。スルホン酸アルキル基又はアミノ置換アルキル基の例として、例えば、スルホン酸メチル基（ $-CH_2SO_3H$ ）、スルホン酸エチル基、アミノメチル基、アミノエチル基、メチルアミノエチル基、およびこれらの塩などを挙げることができる。

【0017】式(I)で示される蛍光性官能基において、 X^- は必要に応じて存在していてもよいアニオン種、例えばハロゲンイオン、酢酸イオン、過塩素酸イオン、炭酸イオンなどを示す。 X^- で示されるこれらのアニオン種は、 $Y-CO-$ 基が置換する母核内の窒素原子上の陽電荷を打ち消し、式(I)で示される蛍光性官能基を全体として中性に維持するために作用する。従って、例えば、式(I)で示される蛍光性官能基中の R^1 、 R^2 、及び R^3 のうちの一つの基がアニオン性の基である場合には、その基の陰電荷が母核内の4級窒素原子上の陽電荷を打ち消して分子内ツピッター・イオンが形成されるので、 X^- が不要になる場合がある。一方、例えば、 R^1 又は R^2 のいずれかがスルホン酸基であり、 R^3 がアミノ置換アルキル基で

ある場合には、これらの基の間で電荷が釣り合うので、 X^- が必要になる場合がある。

【0018】上記一般式(II)で示される蛍光性官能基において、 R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基、又はスルホネート基を示す。 R^4 及び R^5 は、それぞれフェニル基上の任意の位置に置換することができる。アルキル基及びアルコキシ基としては上記のものを用いることができ、スルホネート基（ $-SO_3^-M^+$ ； M^+ はアルカリ金属イオンを示し、 Q^- の対イオンである M^+ とは同一でも異なってもよい）としては、例えばナトリウムスルホネート基又はカリウムスルホネート基などを用いることができる。

【0019】 R^6 は直鎖又は分枝鎖のアルキレン基を示し、例えば、炭素数1~6程度、好ましくは炭素数2~5の直鎖又は分枝鎖の低級アルキレン基、より好ましくは、トリメチレン基、テトラメチレン基、又はペンタメチレン基を用いることができる。 R^6 に置換する $-SO_3^-$ 基は、該アルキレン基の任意の位置に置換することができるが、例えばアルキレン基の末端に置換したものを用いるのが好適である。より具体的にいうと、 $R^6-SO_3^-$ として、例えば $-(CH_2)_k-SO_3^-$ （ k は2~4の整数を示す）で示される基などが好適である。

【0020】 M^+ はアルカリ金属イオンを示す。アルカリ金属イオンとして、好ましくはナトリウムイオン又はカリウムイオンを用いることができる。 Q^- はハロゲンイオン、過塩素酸イオン、又はチオシアン酸イオンを示し、好ましくは、塩素イオン、臭素イオン、又はヨウ素イオンなどを用いることができる。これらのうち、ヨウ素イオンが特に好ましい。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、上記の蛍光性官能基は、 $Y-CO-$ 基が置換する窒素原子上の陽電荷（上記式中 N^+ で示す）と $R^3-SO_3^-$ に由来する陰電荷とを有しているが、 M^+Q^- で示されるアルカリ金属塩が共存すると、窒素原子上の陽電荷（上記式中 N^+ で示す）と Q^- との間、並びに $R^3-SO_3^-$ と M^+ との間で、それぞれイオン結合が形成される。この結果、分子内での対イオン形成が阻止され、分子全体のイオン性が維持されて水溶性が顕著に増大する。

【0021】上記一般式(I)及び(II)において、 Y は炭素数1ないし10の直鎖または分枝のアルキル基、好ましくは炭素数3~5の直鎖若しくは分枝鎖のアルキレン基、より好ましくは、トリメチレン基、テトラメチレン基、又はペンタメチレン基を示す。または、 Y は酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10の直鎖または分枝のアルキル基を示す。 $-Y-CO-$ で示される基としては、例えば、 $-CH_2-CO-$ ； $-(CH_2)_2-CO-$ ； $-(CH_2)_3-CO-$ ； $-(CH_2)_4-CO-$ ； $-(CH_2)_5-CO-$ ； $-CH_2-CO-NH-(CH_2)_5-CO-$ ； $-(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_5-CO-$ ； $-(CH_2)_3-CO-NH-(CH_2)_5-CO-$ ； $-(CH_2)_4-CO-NH-(CH_2)_5-CO-$ ； $-CH_2-CO-NH-(CH_2)_5-CO-NH-(CH_2)_2-CO-$

11

12

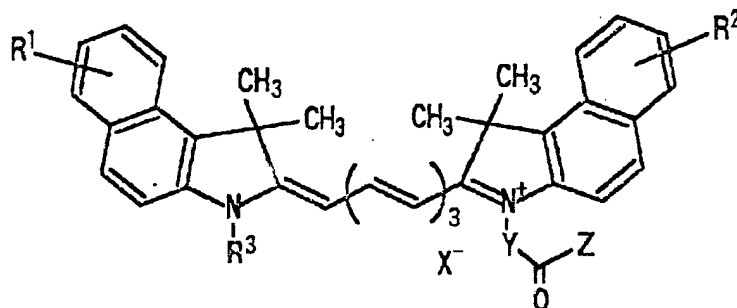
-; $-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-(\text{N}, \text{N}'\text{-piperadiny})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}$ ($\text{N}, \text{N}'\text{-piperadiny}$ は、ピペラジンの1-位に $-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$ 基が置換されており、4-位に $-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}$ 基が置換されていることを示す。以下、同様である。) ; または $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{N}, \text{N}'\text{-piperadiny})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ などを利用することができる。

【0022】また、 $-\text{Y}-\text{CO}-$ 基のカルボニル基が、さらに炭素数1~10の直鎖または分枝のアルキレン基；酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1~10の直鎖または分枝のアルキレン基；

*キレン基；または $-\text{NH}-\text{NH}-$ 基などを介して検出系と結合していてもよい。

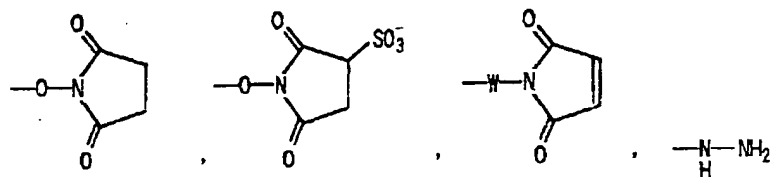
【0023】本発明の診断用マーカーのうち、式(I)で示される蛍光性官能基を有する診断用マーカーの製造には、下記の式(III)の標識用化合物を用いるのが好適である。従って、本発明の一態様によれば、式(I)で示される蛍光性官能基を有する診断用マーカーの製造方法であって、下記の式(III)：

【化9】



(式中、 R^1 , R^2 , R^3 , n , X^- は上記の通りであり、 Z は

下記の式(IV)：

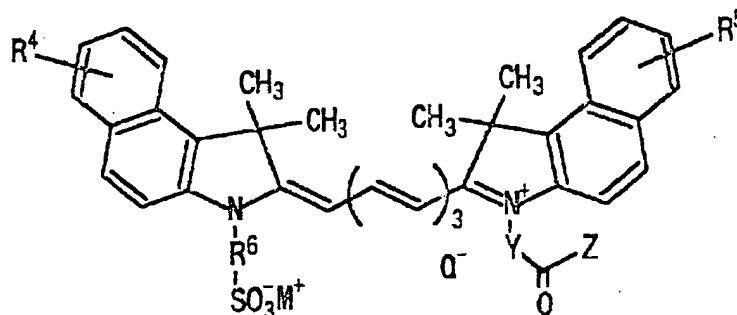


からなる群から選ばれる基を示し； W 及び Y はそれぞれ独立に炭素数1ないし10のアルキル基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキル基を示す)で示される標識用化合物を検出系と反応させる工程を含む方法が提供される。

【0024】また、式(II)で示される蛍光性官能基を有★

★する本発明の診断用マーカーの製造には、下記の式(V)の標識用化合物を用いるのが好適である。従って、本発明の別の態様により、式(II)で示される蛍光性官能基を有する診断用マーカーの製造方法であって、下記の式(V)：

【化11】

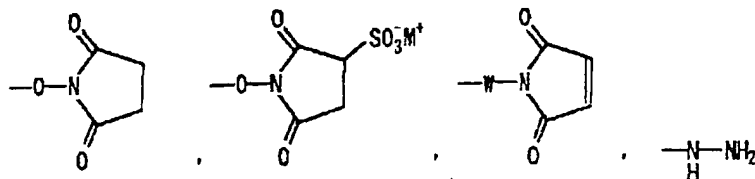


(式中、 R^4 , R^5 , R^6 , n , Y , M^+ , Q^- , 及び W は上記の定義のとおりであり、 Z は下記の式(VI)：

【化12】

13

14



からなる群から選ばれる基を示し；W 及びY はそれぞれ独立に炭素数1ないし10のアルキル基、または酸素原子、窒素原子、及び硫黄原子からなる群から選ばれる1以上の原子を含む炭素数1ないし10のアルキル基を示す) で示される標識用化合物を検出系と反応させる工程を含む方法が提供される。

【0025】上記一般式(III) 及び(V) の化合物において、Y-CO-Z で示される基として、例えば、-CH₂-CO-Z；-(CH₂)₂-CO-Z；-(CH₂)₃-CO-Z；-(CH₂)₄-CO-Z；-(CH₂)₅-CO-Z；-CH₂-CO-NH-(CH₂)₅-CO-Z；-(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₅-CO-Z；-(CH₂)₃-CO-NH-(CH₂)₅-CO-Z；-(CH₂)₄-CO-NH-(CH₂)₅-CO-Z；-CH₂-CO-NH-(CH₂)₅-CO-NH-(CH₂)₂-CO-Z；-(CH₂)₄-CO-(N,N'-piperadiny)- (CH₂)₂-Z；または-CH₂-CO-NH-(CH₂)₅-CO-(N,N'-piperadiny)- (CH₂)₂-Zなどを利用することができる。

【0026】Z で示される基において、W としては上記Y-CO-Zの例示中のY に相当する基を好適に用いることができる。また、N-スルホサクシイミジロキシ基のスルホン酸基の対イオンの M⁺ と式(V) の標識用化合物中の Q⁻ の対イオンの M⁺ とは同一でも異なってもよいが、両者がナトリウムイオンであることが好ましい。上記の標識用化合物のうち式(V) で示される化合物は、例えば、式(V) で示される化合物においてM⁺ X⁻ で示されるアルカリ金属塩が存在しない対イオン型の化合物を製造した後、該化合物をジメチルスルホキシド又はジメチルホルムアミドなどの溶媒に高濃度で溶解し、その溶液にアルカリ金属塩を添加することにより容易に製造することができる。

【0027】なお、本発明の診断用マーカーの製造に用いる上記の標識用化合物のうち、好ましい化合物の製造例を実施例に具体的に説明したが、当業者には、この実施例を参照することにより、出発原料、試薬、反応条件などに適宜修飾・改変を加えて所望の標識用化合物を容易に製造できることが容易に理解されよう。

【0028】Z としてN-サクシイミジロキシ基およびN-スルホサクシイミジロキシ基を用いる場合、これらの基は、Z が結合するカルボニル基とともに反応性の活性エステルを形成するので、検出系に含まれるアミノ基(H₂N-R)は、該活性エステル中のZ と置換して-Y-CO-NH-Rを形成する。また、Z として2-(N-マレイミド)-アルキル基を用いる場合、検出系に含まれるチオール基(HS-R)が反応して、-Y-CO-アルキル-S-Rが形成される。さらに、Z が-NH-NH₂ である場合には、検出系に含まれる還元糖末端のアルデヒド基(OHC-R) が反応して-Y-CO-NH

-NH-CO-Rが形成される。

【0029】従って、標識用化合物と検出系を反応させることにより、式(III) 又は(V) で示される標識用化合物の母核、及び母核に結合しリンカー部分に相当する-Y-CO-部が、蛍光性の官能基として本発明の診断用マーカー中に保存される。もっとも、このような化学構造を有する本発明の診断用マーカーは、上記の方法によって製造されたものに限定されることはなく、いかなる方法により製造されたものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

【0030】また、上記の式(I) 及び(II)で示される蛍光性官能基、式(III) 及び(V) で示される標識用化合物、並びに、実施例中のスキームに示した各化合物においては、便宜上、窒素原子上の陽電荷(上記式中 N⁺ で示す)を母核内の一の窒素原子上に固定して記載したが、共役二重結合を介して陽電荷がもう一つの窒素原子に移動可能であることは当業者に容易に理解される。従って、このような共役に基づく互変異性体はすべて本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

【0031】上記の蛍光性官能基と結合すべき検出系としては、ガンに特異性の高い抗体など各種の抗原を認識する抗体、プローブとして使用可能な核酸、あるいはビオチン-アビジンなどの増幅系に用いられる増幅系物質などを用いることができる。抗体としては、例えば、ガン細胞やガン組織、好ましくは初期ガン細胞や初期ガン組織に特異的に結合する抗ガン抗原抗体を用いることができる。例えば、CEA, AFP, CA19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, CA125, HCG, p53, STN(シアリルTn抗原), c-erbB-2 蛋白に特異的に反応する胃に関する抗腫瘍抗体の他、食道ガン、大腸ガン、直腸ガン、皮膚ガン、子宮ガン等の腫瘍抗原に特異的に反応する抗腫瘍抗体を用いることができる。また、抗病原体蛋白抗体を用いてもよい。核酸としては、特定の遺伝子ないし病原体遺伝子に対するプローブとして使用可能な核酸を用いることができる。

【0032】上記の抗体や核酸を検出系として用いた場合、本発明の診断用マーカーに含まれる上記検出系はガン抗原やガン遺伝子などに特異的に結合するので、ガン細胞やガン組織などの病巣が本発明の診断用マーカーにより免疫的に染色される。その後、赤外線レーザーなどを用いて近赤外線ないし遠赤外線を照射することにより蛍光を発する病巣を確認することができる。

【0033】本発明の診断用マーカーの別の態様は、蛍光性官能基が検出系であるアビジンまたはビオチンなど

の増幅系物質に導入されたものである。例えば、従来汎用のビオチン標識化抗ガン抗原抗体などを生体に適用することにより、抗ガン抗原抗体とビオチン標識化抗体を結合させて標識を行うことができる。そのような標識を行った後、アビジンを検出系として含む本発明の診断用マーカーをビオチン標識化抗体に結合させることにより、ビオチン標識化抗体による標識を本発明の診断用マーカーにより増幅することができ、赤外線レーザーなどにより初期ガンを検出することが可能である。増幅系物質としては、上記のような標識の増幅を可能にするもの

【0034】さらに、上記の抗体又は核酸に上記の増幅系物質を結合したものを、本発明の診断用マーカーの検出系として用いてもよい。例えば、抗ガン抗原抗体にアビジンを結合させた抗体を本発明の診断用マーカーの検出系として用いることができる。あるいは、本発明の診断用マーカーの検出系として、二次抗体を用いることも可能である。上記の説明した検出系は例示のためのものであり、本発明の診断用マーカーに用いることができる検出系は上記のものに限定されることはない。検査・診断の目的となる標的細胞や標的組織に実質的に特異的に結合する性質を有するものならば、いかなるものを検出系として用いてもよい。

【0035】本発明の診断用マーカーは、上記のような蛍光性官能基が検出系と直接あるいはリンカーを介して結合したものに限定されることなく、例えばアルブミン等の蛋白に蛍光性官能基と検出系を導入することにより、アルブミン等の蛋白を介して蛍光性官能基と検出系を結合してもよい。アルブミン等の蛋白には、上記の蛍光性官能基を1または2以上、好ましくは約10個以上導入することができ、抗体などの検出系の導入も容易にできるので、このような蛋白を用いた診断用マーカーは本発明の好ましい態様である。

【0036】さらに、本発明の別の態様に係る診断用マーカーは、600～800 nmの波長の励起光を照射することにより780 nm以上、好ましくは780～840 nm以上の波長の蛍光を発する蛍光性官能基が結合した検出系からなるものである。このような蛍光性官能基としては、上記の式(I)又は(II)由来のもの他、600～800 nmの波長の励起光を照射することにより780 nm以上の波長の蛍光を発するものならば、いかなるものを用いてもよい。このような蛍光性官能基を導入するための化合物は、診断用マーカーの使用目的或使用する励起光の種類などに応じて、当業者により適宜選択可能である。

【0037】このような蛍光性官能基を検出系に結合するために、例えば、シアニン系、フタロシアニン系、ジチオールニッケル錯体系、ナフトキノ・アントラキノ系、インドフェノール系、アゾ系などの近赤外線吸収性の化合物を用いることができる。これらの化合物を直接あるいはリンカーを介して検出系に結合した場合、化

合物の吸収波長が長波長側に移動することがあるので、蛍光性官能基の導入に用いる化合物の励起光の波長は600 nmを下回っても差し支えない。また、蛍光性官能基を検出系に導入するために、用いる上記化合物が上記一般式(III)又は(V)においてZで示される基を有していることが好ましい。このような基が存在しない場合には、当業者に利用可能なリンカーを介して蛍光性官能基と検出系を結合することができる。

【0038】本発明により提供される診断薬は、上記の診断用マーカーを有効成分として含むことを特徴としている。本発明の診断薬は、近赤外線ないし遠赤外線により励起することができ、診断にあたり生体組織やDNAの損傷を惹起することがないので有用である。また、本発明の診断薬は、非常に水溶性に優れているという特徴を有するものである。本発明の診断薬において、780 nmの励起光を照射した場合に820 nm程度より長波長の蛍光を発する診断用マーカーを含む診断薬は特に好ましいものである。本発明の診断薬は、1種あるいはそれ以上の診断用マーカーを含んでもよい。

【0039】本発明の診断薬は、例えば、上記の診断用マーカーを種々の緩衝液などの水性媒体、好ましくは、生理食塩水やリン酸緩衝液などの緩衝液に溶解した溶液剤の形態、あるいは診断・検査に際して用時に生理食塩水やリン酸緩衝液などの緩衝液を添加して溶解できる微粒子状粉末や凍結乾燥粉末形態の固形剤などとして提供されるが、診断薬の形態は上記のものに限定されることなく、当業者が使用目的などに応じて適宜選択可能である。

【0040】本発明の診断薬を製造するには、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物として、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤；ビタミンA、ビタミンE、コエンザイムQなど安定化に寄与しうる薬剤等の製剤用添加物を添加してもよい。

【0041】本発明の診断用マーカーを含む診断薬の使用方法について、例えば、赤外線内視鏡を用いた検査方法について説明すると、病巣の存在が疑われる組織に対して内視鏡的に上記診断薬（濃度0.1～1,000 mg/ml程度のもの）を噴霧あるいは塗布して病変部を染色し、適宜洗浄を行って余分な診断薬を組織から除去した後、近

赤外線ないし遠赤外線、より具体的には、例えば 600～800 nm、好ましくは780 nm程度の波長のレーザー励起光を照射することにより、蛍光を発する病巣部を検出することができる。本発明の診断用マーカーは生体に直接適用できる点に特徴があるが、本発明の診断用マーカーの使用態様は生体に適用するものに限定されることはなく、パラフィン固定化標本などの固定化標本に対して適用可能であることは言うまでもない。

【0042】 蛍光の検出には、例えば、赤外線内視鏡あるいは赤外線顕微鏡などの手段を用いることができ、例えば、透過特性を合わせたフィルター、具体的には、励起光遮断特性を有するフィルターと蛍光検出用フィルターを1枚あるいは2枚以上を組み合わせ用いることができる。本発明の診断用マーカーを生体に適用して内視鏡検査を行う際には、内視鏡としては倍率が10～1,000程度のものを用いることができ、例えば、顕微鏡レベルの倍率を有する赤外線内視鏡などは用いることが好ましい。また、内視鏡には、本発明の診断薬の噴霧あるいは塗布手段と、洗浄手段とが設けられていることが好まし

い。

【0043】 生体外に摘出した組織や標本などに本発明の診断用マーカーを適用する場合には、蛍光の検出に赤外線顕微鏡を用いることができる。また、通常光下にプレバートを観察して染色部位を確認した後に、暗室内で赤外線光源下に赤外線フィルムで撮影を行うか、ビデオフィルムに収録してコンピューターによる画像解析を行うことも可能である。

【0044】

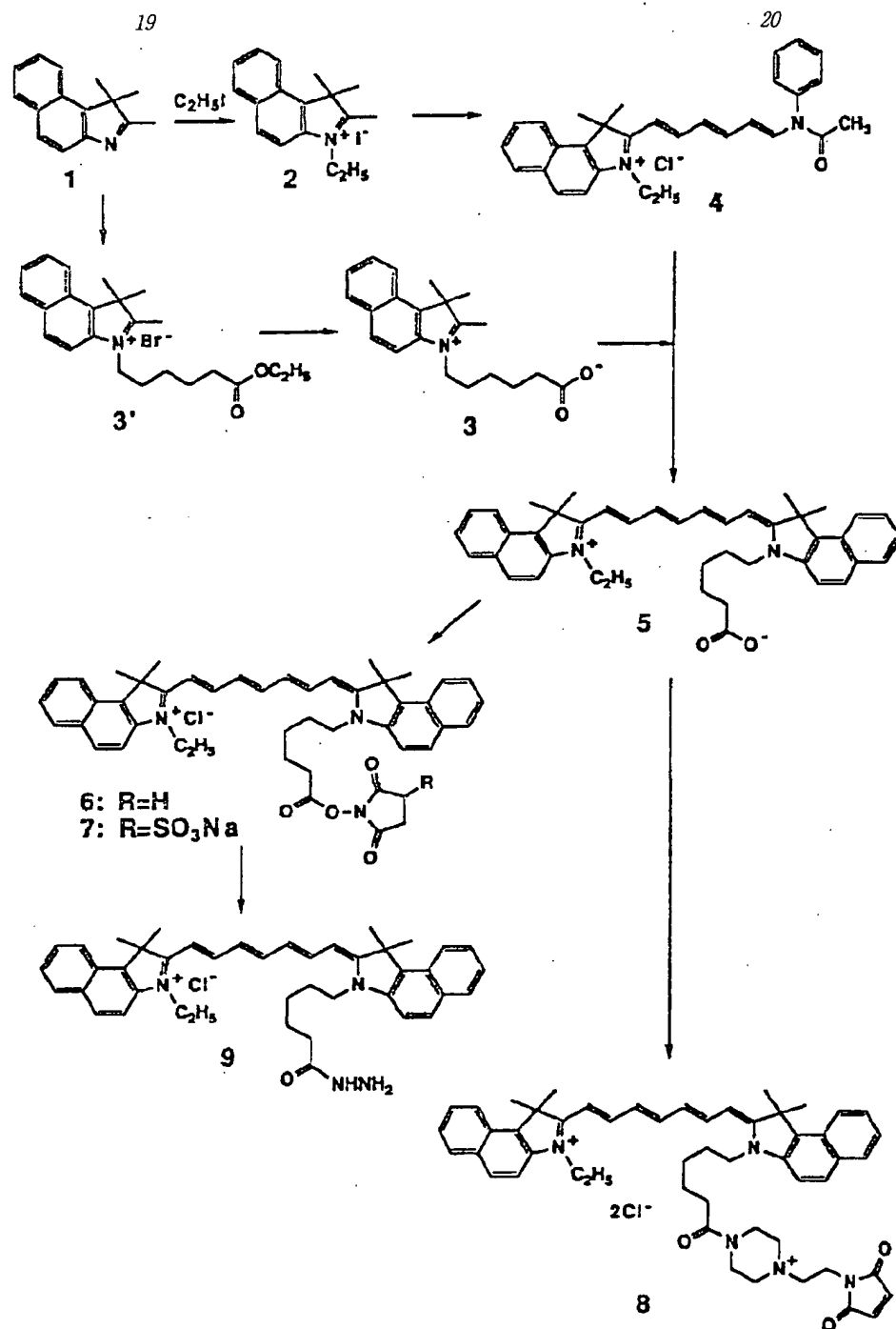
10 【実施例】 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

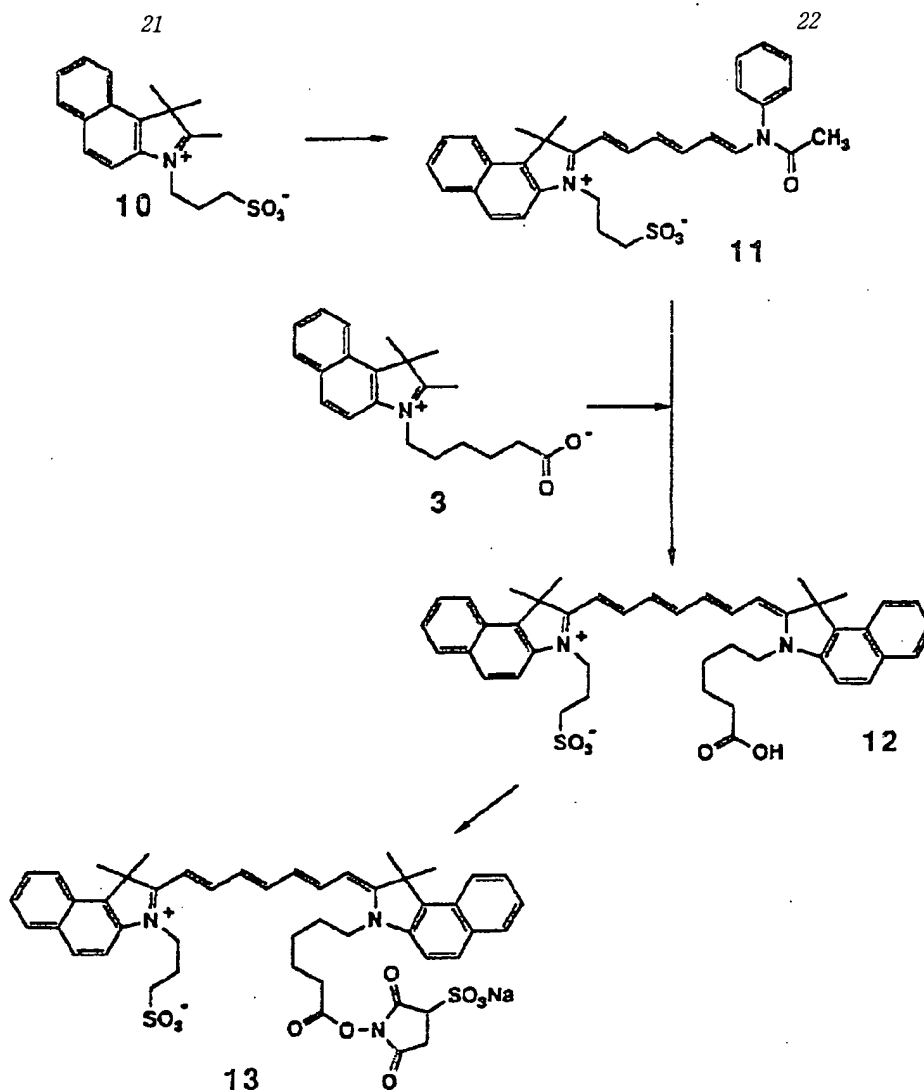
【0045】 例1：標識用化合物の製造

以下のスキームに従って本発明の診断用マーカーの製造に用いる式(III)の標識用化合物を製造した。なお、以下の製造例における化合物番号はスキーム中の化合物番号に対応している。

【0046】

【化13】





【0048】化合物1 (5g, 23.9 mmol, 第一化学薬品株式会社より入手したもの) / アセトニトリル 100 ml にヨウ化エタン (2.84 ml, 35.5 mmol) を加えて5時間還流した。反応液を減圧下濃縮し、残渣にエーテル 200 ml を加えて結晶化させた後、得られた結晶を濾過してエーテルで洗浄した後、減圧下に乾燥して化合物2の淡赤褐色粉末を得た。収量 6.83 g (収率 78.2 %)。

【0049】化合物1 (5g, 23.9 mmol) / DMF 100 ml に6-プロモカプロン酸エチルエステル (6.32 ml, 35.5 mmol) を加えて 80 °C で 16 時間加熱した。反応液を減圧下濃縮し、残渣にエーテル 200 ml を加えて結晶化した後、得られた結晶を濾過してエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥した。1 M 水酸化ナトリウム水溶液 / メタノール = 1 / 1 混合溶液 30 ml を加えて室温で2時間攪拌した。メタノールを減圧留去し、水溶液を 4 M 塩酸水溶液中で中和したのち、クロロホルムで3回洗浄した。水溶液を減圧下に濃縮し、化合物3の赤色固体を得た。収量 5.75 g (収率 74.4 %)。

【0050】化合物2 (5g, 13.7 mmol) とグルタコンアルデヒドジアニル塩酸塩 (3.90 g, 13.7 mmol) を無水酢

酸 50 ml に懸濁し、100 °C で 1.5 時間加熱した。赤色溶液を水 300 ml に注ぎ、生じた黒赤色固体を濾取した。水で洗浄したのち減圧下で乾燥して化合物4の黒赤色粉末を得た。収量 6.02 g (収率 101 %)。

【0051】化合物4 (220 mg, 0.505 mmol) と化合物3 (164 mg, 0.507 mmol) をピリジン 3 ml に溶解し、50 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラム (溶媒: 1 ~ 20 % メタノール / クロロホルム) で精製して化合物5の黒緑色固体を得た。収量 49 mg (収率 15.5 %)。

【0052】化合物5 (40 mg, 64 μmol) / DMF 1 ml に N-ヒドロキシ無水こはく酸 (8.8 mg, 76 μmol) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 26.4 mg, 0.128 mmol) を加え 4 °C で一晩反応させた後、反応液にエーテル 10 ml を加え、生じた残渣をさらにエーテルで3回洗浄した。この固体をクロロホルム 400 μl に溶解し、0.1 M 塩酸水溶液 200 μl を加えて攪拌した後、クロロホルム相を分離し、3回水洗した。クロロホルム溶液を減圧下に濃縮して化合物6 (式(III)の標識用化合物) の黒緑色固体を得た。収量 38 mg (収率 78.5 %)。MS

(FAB) $m/e=720(M^+)$; 蛍光スペクトル : $\lambda_{ex}=769$ nm, $\lambda_{em}=820$ nm (10% DMSO/水)

【0053】化合物5 (20 mg, 32 μ mol) / DMF 1 ml に N- ヒドロキシ無水こはく酸スルホン酸ナトリウム (8.3 mg, 38 μ mol) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (13.2 mg, 64 μ mol) を加えて 4℃ で一晩反応させた後に濾過した。濾液にエーテル 10 ml を加え、生じた残渣を更にエーテルで3回洗浄した。この固体を DMF 400 μ l に溶解し、0.1 M 塩酸水溶液 200 μ l を加えて攪拌した後、クロロホルム相を分離して3回水洗した。クロロホルム溶液を減圧下に濃縮して化合物7 [式(III)の標識用化合物] の黒緑色固体を得た。収量 17 mg (収率 66.4 %)。MS (FAB) $m/e=822 (M+Na)$; 蛍光スペクトル : $\lambda_{ex}=769$ nm, $\lambda_{em}=820$ nm (10% DMSO/水)

【0054】化合物5 (20 mg, 32 μ mol) / DMF 0.5 ml に N-(2-(N'-マレイミド) エチル) ピペラジニ二塩酸塩 (PEM, 4.4 mg, 38 μ mol) とトリエチルアミン (TEA, 20 μ l, 0.146 mmol)、及び DCC (10.2 mg, 49 μ mol) を加えて 4℃ で一晩反応させた後、反応液にエーテル 10 ml を加え、生じた残渣を更にエーテルで3回洗浄した。この固体をクロロホルム 400 μ l に溶解し、0.1 M 塩酸水溶液 200 μ l を加えて攪拌した後、クロロホルム相を分離して3回水洗した。クロロホルム溶液を減圧下に濃縮して化合物8 [式(III)の標識用化合物] の黒緑色固体を得た。収量 20 mg (収率 70.5 %)。MS (FAB) $m/e=814(M^+)$; 蛍光スペクトル : $\lambda_{ex}=773$ nm, $\lambda_{em}=821$ nm (10% DMSO/水)

【0055】例2：標識用化合物の製造

化合物6 (20 mg, 26.4 μ mol) / DMF 0.5 ml にヒドラジン塩酸塩 (9.0 mg, 0.131 mmol) を加えて室温で一晩反応させた。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮した後、残渣をクロロホルム 0.5 ml に溶解し、クロロホルム溶液を3回水洗した。クロロホルム相を減圧下に濃縮して、化合物9の黒緑色固体を得た。収量 16 mg (収率 90.0 %)。MS (FAB) $m/e=637(M^+)$; 蛍光スペクトル :

$\lambda_{ex}=771$ nm, $\lambda_{em}=820$ nm (10% DMSO/水)

【0056】化合物10 (5.0 g, 15.1 mmol) とグルタコンアルデヒドジアニル塩酸塩 (4.40g, 15.1 mmol) を無水酢酸 20 ml と酢酸 300 ml の混合溶液に懸濁し、還流温度で5時間加熱した。赤色溶液を減圧濃縮し、得られた残渣に酢酸エチルと水の混合溶液 200 ml を加えて懸濁させ、黒赤色固体を濾取した。水で洗浄した後、減圧下に乾燥し、化合物11の黒赤色粉末を得た。収量 5.33 g (収率 65.2 %)。

10 【0057】化合物11 (167 mg, 0.308 mmol) と化合物3 (100 mg, 0.309 mmol) をピリジン 3 ml に溶解し、50℃で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮し、得られた残渣を水 10 ml に溶解して溶液の pH を3に合わせた後、セファデックス LH20 カラム (溶媒：水) で精製して、化合物12の黒緑色固体を得た。収量 51 mg (収率 23.1 %)。

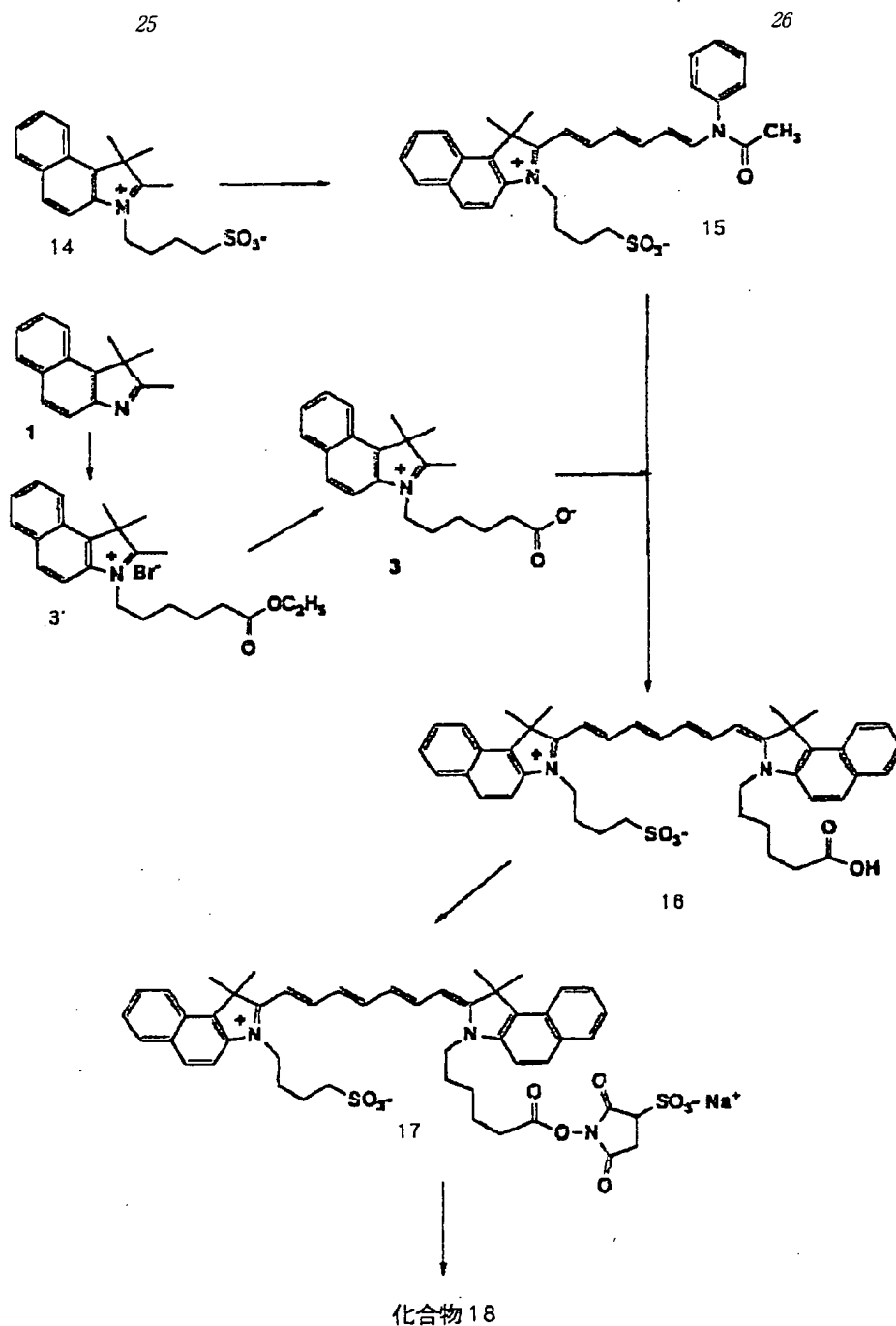
20 【0058】化合物12 (30 mg, 41.8 μ mol) / 50 v/v % THF 水溶液 1 ml に N- ヒドロキシ無水こはく酸スルホン酸ナトリウム (16.8 mg, 77.4 μ mol) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (25.8 mg, 0.125 mmol) を加えて 4℃ で一晩反応させた後に濾過し、濾液を 20℃以下で減圧下濃縮した。残渣に酢酸エチル 10 ml を加え、生じた結晶を更にエーテルで3回洗浄した。この結晶を水 200 μ l に溶解し、セファデックス LH20 カラム (溶媒：水) で精製して、化合物13 [式(III)の標識用化合物] の黒緑色固体を得た。収量 34 mg (収率 88.8 %)。MS (FAB) $m/e=892(M^+)$; 蛍光スペクトル : $\lambda_{ex}=771$ nm, $\lambda_{em}=822$ nm (水)

【0059】例3：標識用化合物の製造

30 以下のスキームに従って本発明の診断用マーカーの製造に用いる式(V)の標識用化合物を製造した。なお、以下の製造例における化合物番号はスキーム中の化合物番号に対応している。

【0060】

【化15】



【0061】化合物14 (5.0 g, 14.5 mmol) とグルタコン
アルデヒドジアニル塩酸塩 (4.23g, 14.5 mmol) を無
水酢酸 20 ml と酢酸 300 ml の混合溶液に懸濁し、還流
温度で5時間加熱した。赤色溶液を減圧濃縮し、得られ
た残渣に酢酸エチルと水の混合溶液 200 ml を加えて懸
濁させ、黒赤色固体を濾取した。水で洗浄した後、減圧
下に乾燥し、化合物15の黒赤色粉末を得た。収量 5.20
g (収率 66.1%)。

【0062】化合物15 (300 mg, 0.553 mmol) と化合物
3 (179 mg, 0.553 mmol) をピリジン 5 ml に溶解し、
50℃で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮し、
得られた残渣を水 10 ml に溶解して溶液の pH を3に合

わせた後、セファデックス LH20 カラム (溶媒: メタノール) で精製して、化合物16の黒緑色固体を得た。収量 105 mg (収率 25.9%)。

【0063】化合物16 (106 mg, 0.145 mmol) / 50 v/v % THF 水溶液 3 ml に N- ヒドロキシ無水こはく酸スルホン酸ナトリウム (65.2 mg, 0.287 mmol) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (129 mg, 0.596 mmol) を加えて4℃で一晩反応させた後に濾過し、濾液を 20℃以下で減圧下濃縮した。残渣に酢酸エチル 10 ml を加え、生じた結晶を更にエーテルで3回洗浄し、化合物17の黒緑色固体を得た。収量 110 mg (収率 80.7%)。MS (FAB) m/e = 906 (M⁺) ; 蛍光スペクトル : λ_{ex} = 768 nm

m, λ_{max} = 807 nm (水)

【0064】上記の化合物17 (100 mg, 0.11 mmol)をメタノール 2 ml に溶かし、ヨウ化ナトリウム 1 g (6.7 mmol) のメタノール 5 ml 溶液を加えた。メタノール溶液を1/2 に減圧濃縮し 4℃で一夜冷却させた後、析出結晶を濾取した。得られた緑色結晶を減圧デシケーターで乾燥して化合物18〔式(V)の標識用化合物〕を得た(85 mg, 収率 72%)。ヨウ化ナトリウムの塩形成前(対イオン型)及び塩形成後の水溶性データおよび赤外線吸収スペクトルデータ(IR)を測定した。また、ヨウ素含量を

【0065】ヨウ化ナトリウムを塩として取り込んだ化合物18と原料として用いた対イオン型のインドシアニングリーンN-ヘキサン酸スルホコハク酸イミドエステル(化合物17)とでは、赤外吸収スペクトルが変化しており、対イオン型化合物17において観測された 2360 及び 1740 cm^{-1} の吸収が化合物18では消失していた(図1参照:(a)は化合物18、(b)は化合物17、すなわち塩形成前のものを示す)。これらの結果から、分子内対イオンを形成している場合とヨウ化ナトリウムの複塩を形成した

【0066】例4: 標識用化合物の製造
例3の方法に準じてインドシアニングリーン-N-ブタン

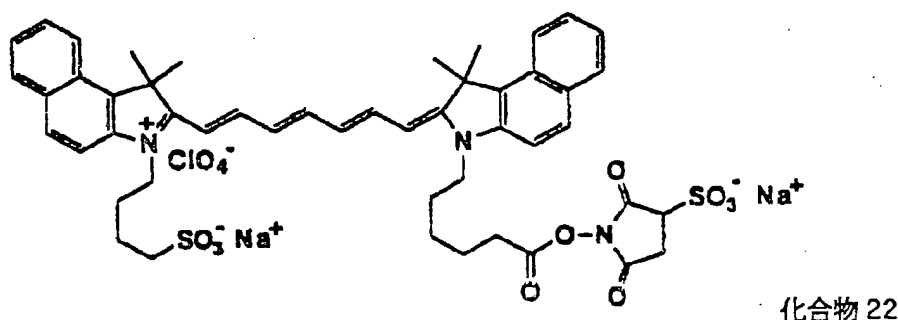
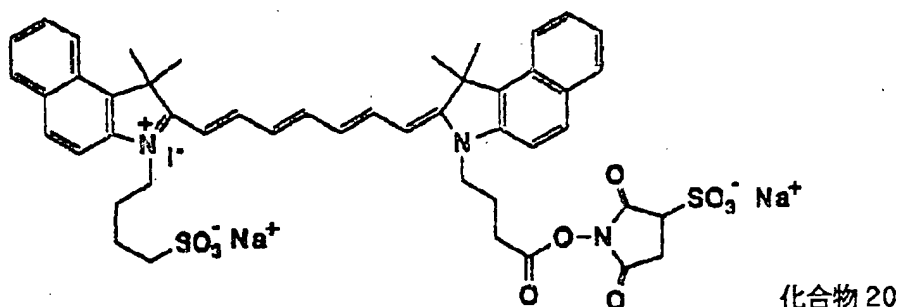
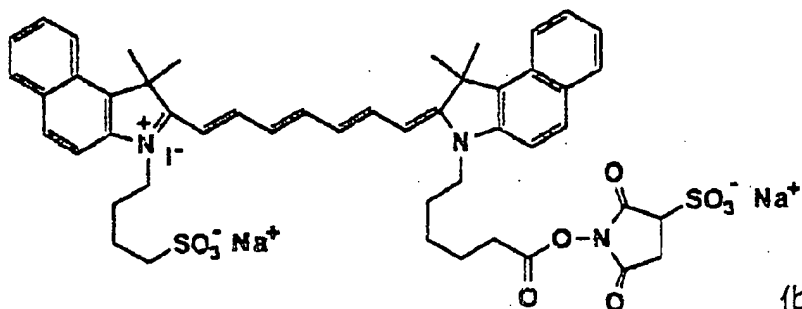
酸スルホコハク酸イミドエステル(化合物19)を製造した。この化合物19 (150 mg, 0.17 mmol)をメタノール 3 ml に溶かし、ヨウ化ナトリウム 1.5 g (10 mmol)のメタノール 8 ml 溶液を加えた。メタノールを1/2 に減圧濃縮し 4℃で一夜冷却させた後、析出結晶を濾取した。得られた緑色結晶を減圧デシケーターで乾燥し、化合物20〔式(V)の標識用化合物〕を得た(117 mg, 収率 66%)。ヨウ化ナトリウムの塩形成前後での水溶性データ及び赤外線吸収スペクトルデータ(IR)を測定した。また、ヨウ素含量をシェーニガー法より求めた。

【0067】例5: 標識用化合物の製造

例3の方法に準じてインドシアニングリーン-N-ヘキサン酸スルホコハク酸イミドエステル(化合物21)を製造した。この化合物21 (100 mg, 0.11 mmol)をメタノール 2 ml に溶かし、過塩素酸ナトリウム 0.3 g (2.5 mmol)のメタノール20 ml 溶液を加えた。メタノールを1/4 に減圧濃縮し 4℃で一夜冷却させた後、析出結晶を濾取した。得られた緑色結晶を減圧デシケーターで乾燥して化合物22〔式(V)の標識用化合物〕23 mg を得た(収率 21%)。過塩素酸ナトリウムの塩形成前後での水溶性データおよび IR を測定した。

【0068】

【化16】



【0069】

【表1】

標識用化合物	対イオン型	複塩形成型
例 3	化合物17	化合物18
水溶性:	1 mg/10 ml 以上	1 mg/0.8 ml
IR (cm ⁻¹):	2360, 1740	左記吸収が消失
I 含量:	—	12.3%
例 4	化合物19	化合物20
水溶性:	1 mg/10 ml 以上	1 mg/0.9 ml
IR (cm ⁻¹):	2370, 1790	左記吸収が消失
I 含量:	—	13.5%
例 5	化合物21	化合物22
水溶性:	1 mg/10 ml 以上	1 mg/5 ml
IR (cm ⁻¹):	2370, 1790	左記吸収が消失

【0070】例6: 標識用化合物の製造

化合物13を例2の方法に従ってヨウ化ナトリウムのメタノール溶液で処理して化合物23を得た。原料として用いた化合物13の赤外線吸収スペクトルと標識用化合物23の

30 赤外線吸収スペクトルを比較したところ、化合物13において観測された2360 及び 1740 cm⁻¹の吸収が化合物23においては観測されなかった。

【0071】例7: 診断用マーカーの製造

(a) 抗体の精製

抗EMA (Epithelial Membrane Antigen) 抗体を含む培養上清液 (ダコ社製, M613) から MabTrap GII (ファルマシア社製) を用いて抗EMA モノクローナル抗体を以下のようにして精製した。4 mlの培養上清に結合緩衝液4 mlを加え、予め結合緩衝液で平衡化した MabTrap GIIカラムに付した。結合緩衝液5 mlで洗浄した後、溶出緩衝液3 mlを加えて溶出緩衝液を0.5 ml毎に分取した。分光光度計を用いて 280 nm の吸光度が 0.05 以上の分画を精製 IgG分画として集め、PD-10 カラム (ファルマシア社製) を用いて 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) に緩衝液交換を行い、SDS-PAGE (第一化学薬品株式会社製) により精製度を確認した。培養上清 4 ml から精製抗 EMAモノクローナル抗体 725 μg を得た。

【0072】(b) 抗体と標識用化合物の結合

上記の精製抗体 500 μg を含有する 100 mM リン酸緩衝液 0.5 ml に ICG-OSu (上記化合物6) のDMF 溶液 0.1

25 ml (0.8 mg/ml) を加え、30℃で30分間静置した。この反応混合液を予め同じ反応緩衝液で平衡化したPD-10 カラムに付し、未反応のICG-OSu を分離した。さらにPD-10 カラムを用いて蛋白分画の緩衝液を0.1 M リン酸緩衝液-0.05 %アジ化ナトリウム(pH 7.4)に交換し、標識用化合物(化合物6)に抗EMA 抗体が結合した本発明の診断用マーカー 74 蛋白 $\mu\text{g/ml}$ を得た。その後、保存にあたって 0.1 %のBSA を添加した。紫外・可視吸収スペクトルを図2に示す。

【0073】上記のスペクトルの測定条件は以下のとおりである。測定機器：日立 U-3200分光光度計；測定溶媒：100 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)，0.05% アジ化ナトリウム；スキャン速度：300.0 nm/min。その後、保存にあたって 0.1 %のBSA を添加した。BCA プロテイン・アッセイ試薬(ピアス社製)により得た抗体濃度と標識用化合物のDMSO中での分子吸光係数とから求めた標識用化合物に対する抗体の結合数は、約12 mol標識用化合物/mol 抗体であった。

【0074】例8：診断用マーカーの製造

化合物18 (1 mg) を水 0.94 mlに溶解して 1 mM 溶液とした。ヒト IgG 1 mgを pH 8.5 の50 mM 炭酸ナトリウムバッファー 1 ml に溶解し、この溶液に化合物18を含む上記の溶液 0.2 ml を加えて 30℃で1時間反応させた。反応液をセファデックス G-25 カラムに付して本発明の診断用マーカーを分離した。分離用のバッファーとしては 50 mMリン酸バッファー(pH 7.4)を用いた。未反応の化合物18はセファデックス・ゲルの上端に残り、診断用マーカーとの分離は良好であった。得られた診断用マーカー 1 mg をとり100 mlの50 mM リン酸バッファー (pH 7.4) に溶解して蛍光スペクトルを測定した結果を図3に示す。

【0075】例9：診断用マーカーの製造

例7で得た精製抗体 500 μg を含有する 100 mM リン酸緩衝液 0.5 ml に化合物18のDMF 溶液 0.125 ml (0.8 mg/ml) を加え、30℃で30分間静置した。この反応混合液を予め同じ反応緩衝液で平衡化したPD-10 カラムに付し、未反応の化合物18を分離した。さらにPD-10 カラムを用いて蛋白分画の緩衝液を0.1 M リン酸緩衝液-0.05 %アジ化ナトリウム(pH 7.4)に交換し、化合物18が抗EMA 抗体に結合した本発明の診断用マーカー 74 蛋白 $\mu\text{g/ml}$ を得た。その後、保存にあたって0.1 %のBSA を添加した。

【0076】例10：標識用化合物と蛋白の結合(参考例)

BSA(和光純薬工業製) 10 mg (0.151 μmol)を HEPES緩衝液 3.0 ml に溶解してBSA 溶液とした。標識用化合物(化合物6) 2.0 mg(2.64 μmol)をDMSO 150 μl に溶解し、上記のBSA 溶液に混合して、冷蔵庫内に一晩放置した。その後、上記の方法と同様にして、PD-10 カラムを

用いてゲル濾過を行い、BSA に標識用化合物由来の蛍光性官能基が導入された標識蛋白を得た。なお、反応終了後のゲル濾過の際には、標識用化合物由来の緑色溶液がカラムに残存しなかったことから、標識用化合物がすべてBSA と反応しており、BSA 1分子あたり蛍光性官能基が約17.5分子導入されたものと考えられる。

【0077】例11：診断用マーカーの製造

(a) BSA (10 mg) を含有する 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 5 mlに化合物6のDMF 溶液 0.5 ml (4.6 mg/ml) を加えて 30℃で 30 分間静置した。この反応混合液をあらかじめ同反応緩衝液で平衡化したセファデックスG25 カラムに付し、未反応の化合物6から標識用化合物と蛋白との結合体(標識化BSA)を分離した。セファデックスG25 カラムを用いて結合体を含む画分の緩衝液を20 mM リン酸緩衝液-0.15 M NaCl (pH 7.0)に交換し、蛍光性官能基を導入したBSA 約 8 mgを得た。

【0078】(b) 抗CEA 抗体 1.0 mg/ml (0.1 M クエン酸/0.15 M NaCl, pH 4.0) にペプシン濃度 0.004 mg/ml となるようにペプシンを添加して、37℃で2時間反応させた。反応液を20 mM リン酸緩衝液、0.15 M NaCl、1 mM EDTA であらかじめ平衡化したTSKgel G3000SWに添加し、F(ab')₂ を未消化のIgG 及び消化断片から分離した(約 500 μg)。上記のF(ab')₂ 画分に2-アミノエタントール塩酸塩を終濃度 10 mMとなるように添加して 37℃で90分間反応させた。反応液をセファデックスG25 カラムに付して2-アミノエタントールを除き、Fab' を含む溶液を得た。

【0079】(c) 標識化BSA (2 mg, 20 mMリン酸緩衝液-0.15 M NaCl, pH 7.0; PBS)に 50 μl の sulfo-SMCS 溶液(sulfo-EMCS, (株) 同仁化学研究所, 1 mg/ml, PBS)を攪拌しながら滴下し、室温にて20分間反応させた。この反応液を予めPBS で平衡化したセファデックスG25 カラムに付し、sulfo-SMCSで活性化された標識化BSAを分離した。この溶液を上記(b)のFab' 溶液に添加し、攪拌下に室温で2時間反応させた。反応終了後、反応混合液をTSKgel G3000SWを用いたゲル濾過により分離・精製し、蛍光性官能基とFab' とが導入されたBSA を得た。

【0080】例12：診断用マーカーを用いた免疫組織化学的染色

本発明の診断用マーカーとして上記例6の診断用マーカーを用い、抗EMA 抗体の染色性が確認された食道粘膜のパラフィン切片(面積約10×10 mm, 厚さ 2.5 μm)あるいは食道ガンの摘出生切片に診断用マーカーを作用させ、ABC 法(アビジン・ビオチン・コンプレックス法)で発色させて、顕微鏡下および通常内視鏡下に観察して染色の程度を確認した。また、上記のようにして発色させたプレパラートを赤外線内視鏡下に観察して染色部位を同定し、通常内視鏡による観察により同定された染色部位との比較を行った。さらに、診断用マーカーの濃度

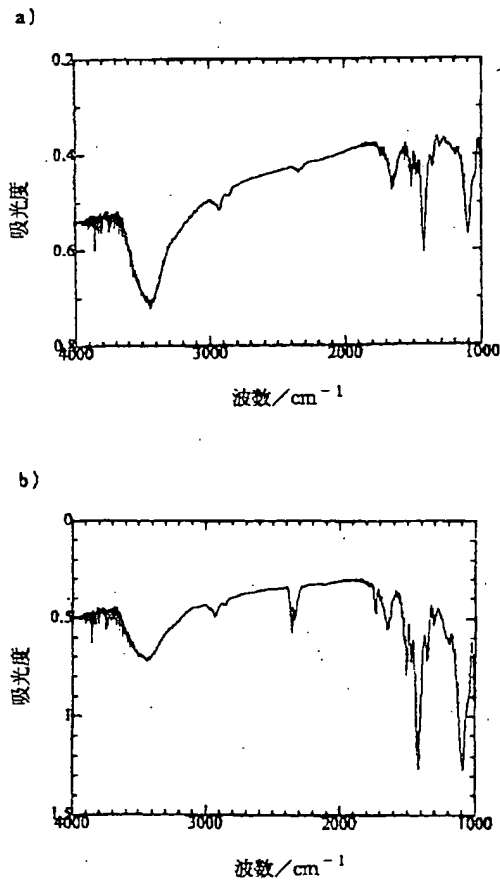
を倍数希釈して、通常内視鏡および赤外線内視鏡で観察し、両者の識別能を検討した。

【0081】診断用マーカの5倍希釈液と10倍希釈液を染色に用いたが、顕微鏡下での発色は良好であり、コントロールとして用いた抗EMA抗体(50倍希釈)に比較しても同程度の染色性が確認できた。通常内視鏡によるプレバートの観察では、10倍希釈した診断用マーカも、コントロールとほぼ同様に食道粘膜に一致して、DAB(Diaminobenzidine)の沈着が認められた。

【0082】

【発明の効果】本発明の診断用マーカを用いることにより、例えば、赤外線内視鏡などを用いて準体的に食道ガン、胃ガン、または大腸ガンなどの上皮性組織の悪性新生物の早期診断や、外科手術時の病巣の特定・診断を簡便かつ正確に行うことができる。本発明の診断用マーカによる検査や診断は、紫外線励起による生体組織やDNAの損傷の心配がなく、生体位のまま直接検査や診断を行うことができるので、生体免疫組織染色法として有用である。また、本発明の診断用マーカに含まれる

【図1】



標識用化合物は極めて水溶性が高いという特徴を有しているため、本発明の診断用マーカは胃腸管から吸収されることがなく、極めて安全に検査や診断を行うことができるので有用である。

【図面の簡単な説明】

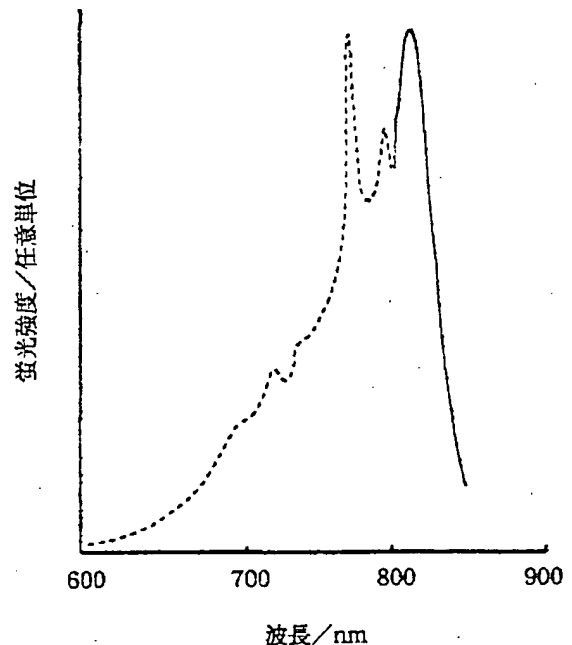
【図1】 標識用化合物(化合物18)の赤外線吸収スペクトルを示す図である。図中、(a)はヨウ化ナトリウム添加により塩を形成した化合物18の赤外線吸収スペクトルであり、(b)は原料として用いたインドシアニングリ

10

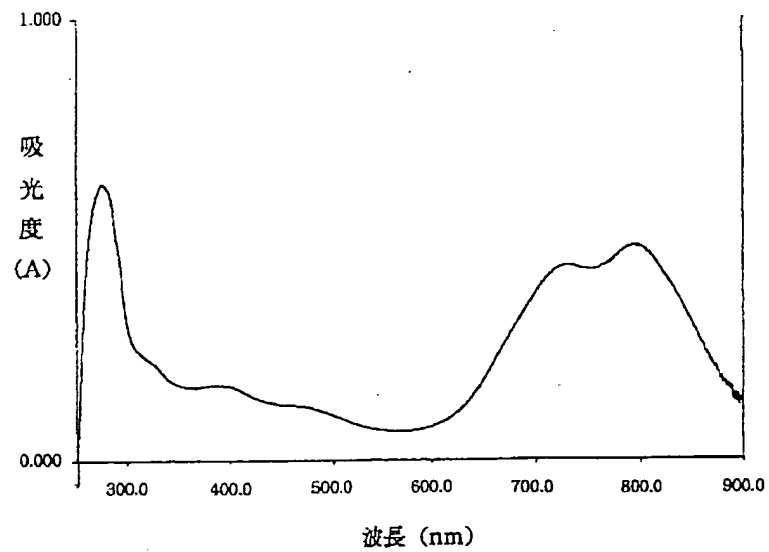
ーン-N-ヘキサン酸スルホコハク酸イミドエステル(化合物17)の赤外線吸収スペクトルである。

【図2】 標識用化合物である化合物6と抗EMA抗体とを結合することにより得られた本発明の診断用マーカ(74 μg/ml)の紫外・可視吸収スペクトルを示す図である。

【図3】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
// A 6 1 K 39/44			A 6 1 K 39/44	
C 0 7 D 209/60			C 0 7 D 209/60	
403/14	2 0 7		403/14	2 0 7
C 0 7 H 21/00			C 0 7 H 21/00	

(72)発明者 竹迫 和浩
熊本県上益城郡益城町古閑56-10

(72)発明者 竹内 博
千葉県鎌ヶ谷市西佐津間1-13-44